



REC'D 27 NOV 2

WIPO

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

REC'D 27 NOV 2002

WIPO

PCT

Aktenzeichen: 102 19 505.6

Anmeldetag: 30. April 2002

Anmelder/Inhaber: Röhm GmbH & Co KG, Darmstadt/DE

Bezeichnung: PH-sensitives Polymer

IPC: C 08 F, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. November 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Holß
BEST AVAILABLE COPY

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein pH-sensitives Polymer, das ein (Meth)acrylat-Copolymer aus 20 bis 65 Gew.-% Acrylsäure- und/oder Methacrylsäure-Einheiten und 75 bis 35 Gew.-% Einheiten von C₁- bis C₁₈-Alkylestern der (Meth)acrylsäure ist, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht im Bereich von 1.000 bis 50.000 g/mol aufweist und in einer Konzentration von 150 µg/ml im Cytotoxizitäts-Test mit menschlichen roten Blutzellen bei pH 5,5 eine Hämolyse von mindestens 60 % und bei pH 7,4 eine Hämolyse von weniger als 1 % bewirkt. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des pH-sensitiven Polymers als Träger für pharmazeutisch wirksame Biomoleküle oder pharmazeutische Wirkstoffe sowie als Bestandteil entsprechender Arzneiformen.



pH-sensitives Polymer

Die Erfindung betrifft ein pH-sensitives Polymer mit cytotoxischen bzw. membranolytischen Eigenschaften bei pH-Werten unterhalb von pH 6,5, das als Träger für natürliche oder synthetische Biomoleküle oder pharmazeutische Wirkstoffe verwendet werden kann.

Stand der Technik

Auf Stimuli reagierende Polymere haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Entsprechende Polymere entfalten veränderte Eigenschaften nach Einwirkung eines chemischen oder physikalischen Einflusses wie z. B., um nur einige zu nennen Temperatur, Lösungsmittel oder pH-Wert. PH-sensitive Polymere sind dabei von besonderem Interesse. So können beispielsweise Carboxylgruppen-hältige Polymere, die bei hohem pH-Wert hydrophile Coil-Strukturen ausbilden, bei niedrigen pH-Werten zu hydrophoben Globulin-Strukturen übergehen (siehe z. B. (1)).

pH-sensitive Polymere stehen im Zusammenhang mit der Verabreichung von Arzneistoffen im Blickpunkt der Forschung. Viele physiologische und pathologische Vorgänge wie Endocytose, Tumorstadium und Entzündungen gehen einher mit einem Wechsel der pH-Bedingungen. Beispiele von pH sensitiven Polymeren, die im Zusammenhang mit der Verabreichung von Arzneistoffen erforscht werden, sind z. B. α -Alkyl-Acrylsäure, wie Poly(2-ethylacrylsäure) und Poly(Propyl-Acrylsäure) (siehe 2), Poly(amidoamine) (siehe 3, 4) und Poly(L-Lysin-iso-phthalamid) (siehe (5)). Die durch pH-Verschiebungen hervorgerufenen Konformationsänderungen beeinflussen die Wechselwirkungen von Polymer und Zellmembranen dahingehend, daß es zu Destabilisierung und Auflösung kommen kann. pH-sensitive Polymere können

als Transportmittel für eine Vielzahl natürlicher oder synthetischer Biomoleküle eingesetzt werden. Sie können mit Lipiden (siehe 6, 7, 8, 14), Proteinen und Peptiden (siehe 9, 10), DANN (4, 11), Immunotoxinen (12), Antikörpern (13) und/oder Wirkstoffen (3) komplexiert werden.

Liste der oben zitierten Literatur

1. M. Watanabe, Y. Kosaka, K. Sanui, N. Ogata, K. Ogushi, and T. Yoden. On the mechanism of polyelectrolyte-induced structural reorganization in thin molecular films. *Macromolecules*, 20: 454-456 (1987).
2. N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirrell, P.S. Stayton, and S. Hoffman. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Controlled Release*, 61: 137-143 (1999).
3. R. Duncan, P. Ferruti, D. Sgouras, A. Tuboku-Metzger, E. Ranucci, and F. Bignotti. A polymer-triton X-100 conjugate capable of pH-dependant red blood cell lysis: A model system illustrating the possibility of drug delivery within acidic intracellular compartments. *J. Drug Targeting*, 2: 341-347 (1994).
4. S.C.W. Richardson, N.G. Patrick, Y.K. Stella Man, P. Ferruti, and R. Duncan. Poly(amodoamine)s as potential nonviral vectors: ability to form interpolyelectrolyte complexes and to mediate transfection in vitro. *Biomacromolecules*, in press (2001).
5. M.E. Eccleston, M. Kulper, F.M. Gilchrist, and N.K.H. Slater. pH-responsive pseudo-peptides for cell membrane disruption. *J. Controlled Release*, 69: 297-307 (2000).
6. T. Chen, L.S. Chol, S. Einstein, M.A. Klippenstein, P. Scherrer, and P.R. Cullis. Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.*, 9: 387-405 (1999).

7. J.L. Thomas and D.A. Tirrell. Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc. Chem. Res.*, 25: 336-342 (1992).
8. X. Guo and F.C. Szoka Jr. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive peg-diortho ester-lipid conjugate. *Bioconjugate Chem.*, 12: 291-300 (2001).
9. C.A. Lackey, N. Murthy, O.W. Press, D.A. Tirrell, A.S. Hoffman, and P.S. Stayton. Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. *Bioconjugate Chem.*, 10: 401-405 (1999).
10. V. Bulmus, Z. Ding, C.J. Long, P.S. Stayton, and A.S. Hoffman. Site-specific polymer-streptavidine bioconjugate for pH-controlled binding and triggered release of biotin. *Bioconjugate Chem.*, 11: 78-83 (2000).
11. P.S. Stayton, N. Murthy, C. Lackey, C. Cheung, R. To, O. Press, and A.S. Hoffman. Bioinspired polymers designed to enhance intracellular delivery of biotherapeutics. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 27: 7330 (2000).
12. C.A. Lackey, N. Murthy, P.S. Stayton, O.W. Press, A.S. Hoffman, and D.A. Tirrell. Enhancement of endosomal release and toxic activity of ricin A chain by a pH-sensitive polymer. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 26: 815-816 (1999).
13. C.A. Lackey, O.W. Press, A.S. Hoffman, and P.S. Stayton. pH-sensitive polymer-protein complexes for control of intracellular trafficking of biomolecular therapeutics. *Polym. Mater. Sci. Eng.*, 84 (2001).
14. K.M. Eum, K.H. Langley, and D.A. Tirrell. Quasi-elastic and electrophoretic light scattering studies of the reorganization of dioleoylphosphatidylcholine vesicle membranes by poly(2-ethylacrylic acid). *Macromolecules*, 22: 2755-2760 (1989).

WO 97/09068 beschreibt interaktive molekulare Konjugate. Es handelt sich insbesondere um auf einen Stimulus reagierende Moleküle, die die Fähigkeit

zur Bindung an eine zelluläre Zielregionen aufweisen, wobei der Stimulus wiederum die Bindungsfähigkeit beeinflusst. Der Stimulus kann durch die Temperatur, einen pH-Wert, bestimmte Ionen oder Ionenstärken, elektrische Felder oder Lösemittel gegeben sein.

Ein auf einen Stimulus reagierendes Molekül kann z. B. ein pH-sensitives Polymer sein, das mit einem an einen Liganden bindenden Molekül, z. B. einem Antigen, einem Antikörper oder einem pharmazeutischen Wirkstoff, kombiniert wird. Das molekulare Konjugat kann auf veränderte Umgebungsbedingungen reagieren, z. B. auf die Veränderung des pH-Wertes von Werten über pH 7,0 im Bereich extrazellulärer Körperflüssigkeiten, z. B. in der Blutbahn, auf Werte unterhalb von pH 6,5, der mit der Aufnahme in lebende Zellen, z. B. durch Endocytose einhergeht.

Allgemein werden Polymere basierend auf radikalisch polymerisierten Vinyl-Typ Monomeren mit Molekulargewichten im Bereich von 1.000 bis 30.000 erwähnt. Zur Koppelung von Proteinen oder Peptiden werden Polymere mit reaktiven Seitengruppen, z. B. $-OH$, $-COOH$ oder bevorzugt $-NH_2$, angeregt.

(Meth)acrylat-Copolymere aus Methacrylsäure-Einheiten und Comonomere wie C_1 - bis C_{12} -Alkylestern der (Meth)acrylsäure sind im Prinzip bekannt und finden insbesondere Anwendung als Überzugs- und Bindemittel für Arzneiformen.

Bekannt sind z. B. Copolymere aus 50 Gew.-% Methacrylsäure und 50 Gew.-% Methylmethacrylat (EUDRAGIT® L), aus 50 Gew.-% Methacrylsäure und 50 Gew.-% Ethylacrylat (EUDRAGIT® L100-55), aus 30 Gew.-% Methacrylsäure und 70 Gew.-% Methylmethacrylat (EUDRAGIT® S). Die handelsüblichen Copolymere weisen Molekulargewicht im Bereich oberhalb von etwa 200.000 g/mol auf.

US 2001/0007666 A1 beschreibt eine Zusammensetzung, die der Erhöhung Transports oder des Freisetzens von Substanzen durch Zellmembranen, Zwischen Zellen, Zellkompartimenten oder Lipidmembranen dient. Die Zusammensetzung besteht aus einem Membran-Transport Agens, das unter anderem ein pH-sensitives Polymer sein kann und physikalischen Mitteln, die die Effektivität des Membran-Transport Agens erhöhen, z. B. eine Ultraschallbehandlung. Als pH-sensitive Polymere sind insbesondere carboxylgruppenhaltige Polymere geeignet, z. B. solche mit einem Anteil von mehr 50% Monomerresten mit Carboxylgruppen. Konkret wird z. B. eine Poly(2-Ethyl-Acrylsäure) mit einem mittleren Molekulargewicht von 62.000 genannt. Weiterhin werden 50 : 50 Copolymere der Acrylsäure mit Ethyl-, Propyl- und Butylacrylat beschrieben. Zur Herstellung wird die Bulkpolymerisation in Gegenwart eines AIBN-Initiators angegeben. Molekulargewichtregler werden nicht erwähnt. Da die Copolymere weiterhin durch Etherfällung gereinigt werden, ist von hohen Molekulargewichten auszugehen. Die Copolymere lysieren bereits in geringen Konzentrationen von wenigen µg Erythrocyten bei pH 5,5 in hohem Maße und bei pH 7,4 zumindest in geringerem Maße.

Aufgabe und Lösung

Das Einschleusen von Biomolekülen oder pharmazeutischen Wirkstoffen in das Cytoplasma und von dort aus eventuell in den Zellkern auf dem Weg über Endosomen erfordert Membran zerstörende Agenzien, die verhindern, daß die Stoffe in die Lysosomen übergehen, wo sie chemisch abgebaut werden können. Daher sind Polymere von Interesse, die bei leicht sauren pH-Werten um pH 6,5 oder niedriger, wie sie in den Endosomen vorherrschen, zur Zerstörung der Zellmembranen führen, aber bei physiologischen pH-Werten um pH 7,4, wie sie außerhalb der Zellen vorkommen nicht membranolytisch wirken.

Die Acrylsäure-Alkylacrylat-Copolymere der US 2001/0007666 A1 haben den Nachteil, daß sie bereits in extrem geringen Konzentrationen zur einer Zellyse führen können. Dies macht sie kritisch in der Dosierbarkeit. Weiterhin besteht der Nachteil, daß es auch bei pH 7,4 noch zu einer gewissen Hämolyse kommen kann, so daß die beschriebenen Copolymere insgesamt schwer kontrollierbar sind und falls sie in extrem geringen Mengen zur Anwendung kommen nur eine geringe Beladbarkeit mit Biomolekülen oder pharmazeutischen Wirkstoffen ermöglichen.

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Arzneiformen, die ihre Wirkung spezifisch in bestimmten Zelltypen entfalten sollen, besteht daher ein weiterer Bedarf an geeigneten polymeren Trägermolekülen. Es sollten pH-sensitive Polymere entwickelt werden, die im Bereich von pH 7,0 oder leicht darüber keine oder nur in hohen Konzentrationen cytotoxische Eigenschaften aufweisen, aber unterhalb von pH 6,5 bereits in geringer Konzentration in vivo zelltoxisch, bzw. hämolytisch bzw. membranolytisch wirken. Die Polymere sollen als Träger für natürliche oder synthetische Biomoleküle oder pharmazeutische Wirkstoffe geeignet sein, die auf den Weg über die Aufnahme in Endosomen und deren anschließende Destabilisierung oder Lyse intrazellulär freigesetzt werden sollen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein

PH-sensitives Polymer, das ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

20 bis 65 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
75 bis 35 Gew.-% Einheiten von C₁- bis C₁₈-Alkylestern der
(Meth)acrylsäure ist,

dadurch gekennzeichnet, daß

es ein Molekulargewicht im Bereich von 1.000 bis 50.000 g/mol aufweist

und in einer Konzentration von 150 µg/ml im Cytotoxizitäts-Test mit menschlichen roten Blutzellen bei pH 5,5 eine Hämolyse von mindestens 60 % und bei pH 7,4 eine Hämolyse von weniger als 5 % bewirkt.

Ausführung der Erfindung

(Meth)acrylat-Copolymere

Die Erfindung betrifft ein

PH-sensitives Polymer, insbesondere mit membranolytischen bzw. zelltoxischen Eigenschaften bei pH-Werten unterhalb von pH 6,5, das ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

20 bis 65 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
75 bis 35 Gew.-% Einheiten von C₁- bis C₁₈-Alkylestern der (Meth)acrylsäure
ist,

C₁- bis C₁₈-Alkylestern der (Meth)acrylsäure, insbesondere lineare oder verzweigte C₁- bis C₁₈-Alkylestern der (Meth)acrylsäure, sind z. B.:

Methylacrylat, Ethylacrylat, Vinylacrylat, Propylacrylat, Butylacrylat,
Hexylacrylat, Octylacrylat, Decylacrylat, Dodecylacrylat, Myristylacrylat,
Laurylacrylat, Cetylacrylat, Stearylacrylat, Methylmethacrylat, Ethylmethacrylat,

Propylmethacrylat, Butylmethacrylat, Isobutylmethacrylat, Hexylmethacrylat, 2-Ethyl-hexyl(meth)acrylat, Phenylmethacrylat, Octylmethacrylat, Decylmethacrylat, Dodecylmethacrylat, Myristylmethacrylat, Laurylmethacrylat, Cetyl-methacrylat, Stearyl-methacrylat.

Die Esterkomponenten können verzweigt oder cyclisiert sein.

Bevorzugt sind die C₁- bis C₈-Alkylester der Acryl- oder Methacrylsäure, insbesondere Methylmethacrylat, Ethylmethacrylat, Butylmethacrylat, 2-Ethylhexylmethacrylat, Methylacrylat, Ethylacrylat, Butylacrylat und 2-Ethylhexylacrylat.

In der Regel addieren sich die genannten Anteile zu 100 Gew.-%. Es können jedoch zusätzlich, ohne daß dies zu einer Beeinträchtigung oder Veränderung der wesentlichen Eigenschaften führen muß, geringe Mengen im Bereich von 0 bis 10, z. B. 0,1 bis 5 oder nicht mehr als 2,5 Gew.-% weiterer vinylich copolymerisierbarer Monomere, die nicht zwingend (Meth)acrylate sein müssen, enthalten sein, z. B. Butylacrylat, Butylmethacrylat, Methylacrylat, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat, Methacrylamid oder Styrol. Vernetzende Monomere sind in der Regel nicht enthalten.

(Meth)acrylat-Copolymere-Varianten

Für die Zwecke der Erfindung geeignet sind bevorzugt (Meth)acrylat-Copolymere aus:

20 bis 60 insbesondere 35 bis 55 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und 60 bis 80, insbesondere 65 bis 45 Gew.-% Methylmethacrylat-Einheiten.

40 bis 60 insbesondere 45 bis 55, z. B. 50 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und 60 bis 40, insbesondere 55 bis 45, z. B. 50 Gew.-% Methylmethacrylat-Einheiten (Typ EUDRAGIT® L).

20 bis 40 insbesondere 25 bis 35, z. B. 30 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und 80 bis 60, insbesondere 65 bis 75, z. B. 70 Gew.-% Methylmethacrylat-Einheiten (Typ EUDRAGIT® S).

40 bis 60 insbesondere 45 bis 55, z. B. 50 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und 60 bis 40, insbesondere 55 bis 45, z. B. 50 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten (Typ EUDRAGIT® L100-55).

40 bis 60 insbesondere 45 bis 55, z. B. 50 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und 60 bis 30, insbesondere 45 bis 35, z. B. 50 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten, sowie 2 bis 20 Gew.-%, z. B. 10 Gew.-% Butylmethacrylat (Typ EUDRAGIT® L100-55 mit Butylmethacrylat).

40 bis 60 insbesondere 45 bis 55, z. B. 50 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und 60 bis 40, insbesondere 55 bis 45, z. B. 50 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten, sowie 0,1 bis 2 Gew.-% eines C₈- bis C₁₂-Esters der Acryl- oder Methacrylsäure, bevorzugt Dodecylmethacrylat. (Typ EUDRAGIT® L100-55 mit geringem Anteil eines langkettigen Alkylesters). Das Copolymere kann bevorzugt in Gegenwart von 5 bis 15 Gew.-% Dodecylmercaptan oder 2 bis 10 Gew.-% 2-Ethylhexylthioglycolat hergestellt werden und variiert je nachdem in seinen Eigenschaften.

20 bis 40, insbesondere 25 bis 35, z. B. 30 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten, 25 bis 45, insbesondere 30 bis 40, z. B. 35 Gew.-%

Methylmethacrylat-Einheiten, 25 bis 45, insbesondere 30 bis 40, z. B. 35 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten (Typ EUDRAGIT® mittlerem Säuregehalt).

In der Regel addieren sich die genannten Anteile zu 100 Gew.-%. Es können jedoch zusätzlich, ohne daß dies zu einer Beeinträchtigung oder Veränderung der wesentlichen Eigenschaften führen muß, geringe Mengen im Bereich von 0 bis 10, z. B. 0,1 bis 5 oder nicht mehr als 2,5 Gew.-% weiterer vinyllisch copolymerisierbarer Monomere, die nicht zwingend (Meth)acrylate sein müssen, enthalten sein. Zu nennen sind z. B. Butylacrylat, Butylmethacrylat, Methylacrylat, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat, Methacrylamid oder Styrol.

Molekulargewicht

Das Molekulargewicht (Gewichtsmittel) des (Meth)acrylat-Copolymeren liegt im Bereich von 1.000 bis 50.000 g/mol, bevorzugt im Bereich von 10.000 bis 40.000 g/mol, insbesondere im Bereich von 20.000 bis 30.000. Das Molekulargewicht kann z. B. durch Viscosimetrie oder Gelausflußchromatographie (GPC) bestimmt werden. Viscosimetrische Werte (Grenzviscositätszahl) können in Chloroform oder in DMF (Dimethylformamid) bei 23 °C bestimmt werden und sollen bevorzugt im Bereich von 10 bis 20, bevorzugt 11 bis 15 $\eta_{\text{spez/0}}$ (cm³/g) liegen. Viscositätszahlen können z. B. nach ISO 1628-6 gemessen werden.

Hämolytische Wirkung

Ab einer hämolytischen Aktivität (Hämolyse) von 5 % spricht man von einer zelltoxischen Wirkung. Die hämolytische Aktivität soll bei pH 7,4 weniger als 5 % betragen und bei pH 5,5 hoch sein und z. B. mindestens 30, mindestens 40,

mindestens 50 oder mindestens 60 % betragen. Es ist günstig, wenn diese Wirkung bei gut dosierbaren Copolymer-Konzentrationen von 20 bis 300, bevorzugt 50 bis 250, insbesondere von 100 bis 200 µg Copolymer/ml bezogen auf eine Erythrozyten-Konzentration von 1×10^8 RBC/ml erreicht wird.

Das (Meth)acrylat-Copolymere bewirkt in einer Konzentration von 150 µg/ml im Cytotoxizitäts-Test mit menschlichen roten Blutzellen bei pH 5,5 eine Hämolyse von mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 80 % und bei pH 7,4 eine Hämolyse von weniger als 5 %, bevorzugt von weniger als 2,5, besonders bevorzugt von weniger als 1 %.

Der Cytotoxizitäts-Test mit menschlichen roten Blutzellen (Erythrocyten) kann in Anlehnung an die Methode von Murthy et al. ausgeführt werden N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirell, P.S. Stayton, and S. Hoffman. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Controlled Release*, 61: 137-143 (1999).

Dabei werden aus frischem Blut gewonnene menschliche rote Blutzellen (Red Blood Cell = RBC) durch Zentrifugation in Gegenwart von K3 EDTA separiert. Die Zellen werden dabei für 5 min bei 4 °C und 200 g sedimentiert und anschließend dreimalig durch erneute Zentrifugation und Aufnahme in Phosphat-gepufferte Saline (PBS-Puffer, 34 mM, pH 7,4, 0,9 % NaCl Gew./Vol. (75 mM))) gewaschen. Die Zellzahl der resultierenden Suspension kann mit einem Häemocytometer bestimmt werden.

Der Hämolyse-Test wird ausgeführt durch Zugabe der menschlichen roten Blutzellen (RBC) im jeweiligen Medium zur einer Copolymer-Suspension bei einer Zellkonzentration von 1×10^8 RBC/ml. Der Ansatz wird für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Zelltoxische Wirkung auf Makrophagen-Typ Zellen

Im Gegensatz zu roten Blutzellen, bei denen die Zellyse vermutlich hauptsächlich durch eine Interaktion der Copolymere mit der äußeren Zell-Membran erfolgt, können die Makrophagen-Zelltypen die Copolymere aktiv aufnehmen, so daß davon auszugehen ist, daß hier andere Wechselwirkungen eine Zellyse verursachen können. Da auch Makrophagen-Zelltypen zu den Zielzellen einer möglichen Therapie verschiedener Krankheiten gehören können, sind solche (Meth)acrylat-Copolymere bevorzugt, die auch im MTT-Test oder im LDH-Test (Lactose-Dehydrogenase-Test) mit dem Maus Makrophagen-Zelltyp J774A.1 (siehe Beispiel 5) bereits bei niedrigen Konzentrationen eine Zellyse beziehungsweise Toxizität zeigen. Die Zelllinie J774A.1 ist z. B. bei öffentlichen Stammsammlung ATCC (America Type Culture Collection, Manassas, VA 20108) unter der Nr. TIB-67 verfügbar (J774A.1 mouse cells; immortalized macrophage-like cells (not tumoral); siehe auch: Ralph P et al. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. J. Exp. Med. 143: 1528-1533, 1976 PubMed: 76192838.

MTT-Test (Inhibierung von Zellen einer Makrophagen-Typ Zelllinie):

Der colorimetrische Test weist lebende Zellen nach, die den gelben MTT-Farbstoff ($\text{MTT} = 3-(4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl})-2,5\text{-diphenyl-tetrazolium-bromid}$) zu einem dunkelblauem Formazan-Produkt reduzieren. Der Test eignet sich zum Nachweis von Cytotoxizität, Zellproliferation und Zellaktivierung. Dienen (siehe z. B. T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65:55-63 (1983)).

Anhand freigegebener LDH wird auf den Grad der Abtötung der Makrophagen-Zellen geschlossen (NC. Phillips, L. Gagné, N. Ivanoff, G. Riveau. (1996) Vaccine 14(9), 898-904. Der Lactose-Dehydrogenase-Test zur messung der freigegebenen LDH (siehe P.G. Cabaud and F. Wroblewski in Am J Clin Pathol (1958) 30, 234-236) kann mit handelsüblichen Test-Kits z. B. Sigma Kit (procedure no.500) ausgeführt werden.

Bevorzugt sind daher (Meth)acrylat-Copolymere, die bei einer Konzentration im Bereich von 0,03125 mg / ml im MTT-Test mit dem Makrophagen-Zelltyp J774A.1 (ATCC TIB-67) einen Wert von höchstens 50 %, bevorzugt höchstens 40 % bezogen auf eine 100 % Überlebensrate im Kontrollversuch bewirken.

Bevorzugt sind daher (Meth)acrylat-Copolymere, die bei einer Konzentration im Bereich von 0,03125 mg / ml im LDH-Test mit dem Makrophagen-Zelltyp J774A.1 (ATCC TIB-67) einen Wert von mindestens 20 %, bevorzugt mindestens 35 % bezogen auf 100 % Zellyse (Toxizität) im Kontrollversuch bewirken.

Herstellung der pH-sensitiven Polymere bzw. (Meth)acrylat-Copolymere

Die pH-sensitiven Polymere werden durch radikalische Polymerisation der Monomeren in Gegenwart von Polymerisationsinitiatoren und Molekulargewichtsreglern mittels Block-, Perl- oder Emulsionspolymerisation und Austragen des Polymerisats dargestellt. Als weitere Herstellungsverfahren sind grundsätzlich auch 'Group Transfer Polymerization' (GTP) oder 'Atom Transfer Radical Polymerization' (ATRP) geeignet (siehe z. B. Matyjaszewski, K. et al., Chem. Rev. 2001, 101, 2921-2990). Die resultierenden Polymerstrukturen sind statistische Copolymere oder Blockcopolymere.

Bevorzugt ist die Emulsionspolymerisation in Gegenwart von 2 bis 15 Gew.-% Molekulargewichtsreglern, einem Emulgatoranteil im Bereich von 0,1 bis 2 Gew.-%, einer Polymerisationsinitiatormenge im Bereich von 0,02 bis 0,4 Gew.-% und bei Temperaturen von 65 bis 90 °C. Bevorzugt ist ein Emulgatorgemisch, bevorzugt aus Natriumlaurylsulfat, z. B. 0,1 bis 0,5 Gew.-%, und Polyoxyäthylen-20-Sorbitanmonooleat, z. B. 0,4 bis 1,5 Gew.-%. Als Initiatoren sind insbesondere Natriumperoxodisulfat oder Ammoniumperoxodisulfat geeignet. Man kann auf diese Weise z. B. eine Dispersion mit 20 bis 40 Gew.-% Feststoffgehalt herstellen und das Copolymer durch Sprühtrocknung oder durch Coagulation und Abpressen des Wasser in einem Extruder gewinnen. Anschließend wird das Polymerisat bevorzugt in einem organischen Lösemittel gelöst, durch mehrfache Dialyse gegen Wasser gereinigt und bevorzugt gefriergetrocknet.

Beispielhaft für Polymerisationsinitiatoren seien genannt: Azoverbindungen wie 2,2'-Azobis-(isobutyronitril) oder 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril), Redox-Systeme, wie beispielsweise die Kombination von tertiären Aminen mit Peroxiden oder bevorzugt Peroxide (vgl. hierzu beispielsweise H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, "Acryl- und Methacrylverbindungen", Springer, Heidelberg, 1967 oder Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 1, Seiten 386ff, J. Wiley, New York, 1978). Beispiele geeigneter Peroxid-Polymerisationsinitiatoren sind Dilauroylperoxid, tert.-Butylperoctoat, tert.-Butylperisononanoat, Dicyclohexylperoxidicarbonat, Dibenzoylperoxid oder 2,2-Bis-(tert.-butylperoxy)-butan.

Man kann auch bevorzugt die Polymerisation mit einem Gemisch verschiedener Polymerisationsinitiatoren unterschiedlicher Halbwertszeit durchführen, beispielsweise Dilauroylperoxid und 2,2-Bis-(tert.-butylperoxy)-butan, um den Radikalstrom im Verlauf der Polymerisation sowie bei verschiedenen Polymerisationstemperaturen konstant zu halten. Die eingesetzten Mengen an

Polymerisationsinitiator liegen im allgemeinen bei 0,01 bis höchstens 1 Gew.-% bezogen auf das Monomerengemisch.

Die Einstellung der Molekulargewichte der Copolymerisate (CP) erfolgt durch Polymerisation des Monomerengemisches in Gegenwart von Molekulargewichtsreglern, wie insbesondere von den dafür bekannten Mercaptanen, wie beispielsweise n-Butylmercaptan, n-Dodecylmercaptan, 2-Mercaptoethanol oder 2-Ethylhexylthioglycolat, wobei die Molekulargewichtsregler im allgemeinen in Mengen von 0,05 bis 15 Gew.-% bezogen auf das Monomerengemisch, bevorzugt in Mengen von 0,1 bis 10 Gew.-% und besonders bevorzugt in Mengen von 2 bis 12 Gew.-% auf das Monomerengemisch eingesetzt werden (vgl. beispielsweise H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, "Acryl- und Methacrylverbindungen", Springer, Heidelberg, 1967; Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. XIV/1, Seite 66, Georg Thieme, Heidelberg, 1961 oder Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 1, Seiten 296ff, J. Wiley, New York, 1978). Bevorzugt wird als Molekulargewichtsregler n-Dodecylmercaptan oder 2-Ethylhexylthioglycolat eingesetzt. Ethylhexylthioglycolat bietet den Vorteil, daß die Hydrophobizität des (Meth)acrylat-Copolymeren beeinflusst werden kann, da der Regler endständig ins Molekül eingeht. 5 bis 15 Gew.-% Dodecylmercaptan oder 2 bis 10 Gew.-% 2-Ethylhexylthioglycolat sind bevorzugte Einsatzmengen.

Konjugate

Das pH-sensitive Polymer kann bestimmungsgemäß als Konjugat mit einem pharmazeutisch wirksamen natürlichen oder synthetischen Biomolekül oder einem pharmazeutische Wirkstoff vorliegen. Das Konjugat kann reversibel oder irreversibel kovalent durch chemische Brückenbindung oder nebervalent über

Van der Waals-Kräfte, ionische Bindungen, hydrophobe Bindung hergestellt sein.

Verwendungen

Die pH-sensitiven Polymere können als Träger für natürliche oder synthetische Biomoleküle oder pharmazeutische Wirkstoffe verwendet werden, die auf den Weg über die Aufnahme in Endosomen und deren anschließende Destabilisierung oder Lyse Intrazellulär freigesetzt werden sollen.

Die pH-sensitiven Polymere können zur Komplexierung bzw. als Konjugate mit Lipiden, Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren (DNA und RNA), insbesondere Oligonukleotiden, Antisense-DNA oder Antisense-RNA, Plasmid-DNA, Nukleotiden, Hormonen, Toxinen, Immunotoxinen, Antikörpern oder Fragmenten davon oder pharmazeutischen Wirkstoffen verwendet werden. Die Komplexierung bzw. Konjugat-Bindung kann reversibel oder irreversibel kovalent durch chemische Brückenbindung oder nebenvalent über Van der Waals-Kräfte, ionische Bindungen, hydrophobe Bindung geschehen. Der erhaltene Komplex kann als wirksamer Bestandteil zur Herstellung einer Arzneiform, insbesondere einer dermalen, transdermalen, parenteralen, nasal, pulmonalen, vaginalen oder oralen Arzneiform verwendet werden.

Die pH-sensitiven Polymere bzw. die Konjugate können gegebenenfalls Bestandteil von Mikropartikeln, Nanopartikeln, Liposomen, Emulsionen und/oder Lipidviskeln sein.

Die genannte Verwendung kann bevorzugt als Träger für pharmazeutische Wirkstoffe aus den Wirkstoffklassen der Analgetika, Antiallergika, Antirheumatika, Antibiotika, Antinfektiva, Antiparkinsonmittel, Antipsoriatika,

Antitumormittel, Dermatika, Gichtmittel, Immunregulatoren, Magen-Darmmittel, neurotrope Mittel, Ophtalmika, Zytostatika erfolgen.

Mögliche Krankheiten:

Krebs, Infektionen (einschließlich HIV), Herz-Kreislauferkrankungen (z. B. Arteriosklerose), Arthritis, neurodegenerative Erkrankungen (Parkinson, Multiple Sklerose, Alzheimer), genetisch bedingte Enzymmangelerkrankungen, Hepatitis B und C, Mukoviscidose, Hypercholesterämie, Mongolismus, Muskeldystrophie, Autoimmunkrankheiten Gürtelrose und Herpes, Psoriasis, CMV-Retinitis, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Diabetes, erfolgen.

Die im Sinne der Erfindung eingesetzten Arzneistoffe sind dazu bestimmt, am oder im menschlichen oder tierischen Körper Anwendung zu finden, um

1. Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen.

2. die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers oder seelische Zustände erkennen lassen.

3. vom menschlichen oder tierischen Körper erzeugte Wirkstoffe oder Körperflüssigkeiten zu ersetzen.

4. Krankheitserreger, Parasiten oder körperfremde Stoffe abzuwehren, zu beseitigen oder unschädlich zu machen oder

5. die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers oder seelische Zustände zu beeinflussen.

Gebräuchliche Arzneistoffe sind Nachschlagewerken, wie z. B. der Roten Liste oder dem Merck Index zu entnehmen.

Insbesondere sind die Wirkstoffe Amphotericin B, Adriamycin zu nennen.

Die Arzneiform kann z. B. zur Therapie von Tumoren, cardiovascularen Krankheiten oder rheumatischer Arthritis dienen. Ebenso ist die Gentherapie von Erbkrankheiten oder die prophylaktische Therapie solcher Erkrankungen mit Hilfe der erfindungsgemäßen pH-sensitiven Polymere als Bestandteil entsprechender Arzneiformen in Zukunft denkbar. Gegenüber viralen Systemen zur Übertragung von Nukleinsäuren in lebende Zellen, haben nicht virale Systeme generell den Vorteil, daß sie leichter herstellbar sind, keine Replikation des Vektors involviert ist, und daß die Gefahr immunologischer Reaktionen geringer ist.

Modifikationen der Eigenschaften

a) Beeinflussung der Konformation durch Bindung weiterer Moleküle

Die Eigenschaften, z. B. die toxische bzw. membranolytische Wirksamkeit, der (Meth)acrylat-Copolymere auf rote Blutzellen und/oder Makrophagen-Typ Zellen oder deren physikalische Eigenschaften können durch die durch kovalente oder nebenvalente Kopplung mit anderen Molekülen insbesondere konformationsändernden Agenzien z. B. Farbstoffen, insbesondere hydrophoben Farbstoffen, z. B. mit Rhodamin B, modifiziert werden. Geeignete Kopplungsmethoden für Carboxylgruppen-haltige (Meth)acrylat-Copolymere sind dem Fachmann bekannt.

Man kann z. B. ein mit einem Farbstoff, bevorzugt mit einem hydrophoben Farbstoffen, insbesondere mit Rhodamin B modifiziertes bzw. gekoppeltes

modifiziertes (Meth)acrylat-Copolymer aus

25 bis 65 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
75 bis 35 Gew.-% Einheiten von C₁- bis C₁₂-Alkylestern der
(Meth)acrylsäure erhalten.

Bevorzugt ist ein mit einem Farbstoff, bevorzugt mit einem insbesondere
hydrophoben Farbstoffen, insbesondere ein mit Rhodamin B modifiziertes
(Meth)acrylat-Copolymer aus

40 bis 60 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
60 bis 40 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten.

Bevorzugt ist ein theoretisch ermitteltes Kopplungsverhältnis, bei dem 5 bis 100
%, bevorzugt 5 bis 20 %, der Copolymer-Moleküle mit einem Farbstoffmolekül
gekoppelt sind.

Die Kopplung bietet z. B. den Vorteil, daß das Löslichkeitsverhalten modifiziert
werden kann. Man kann z. B. einen steilen Anstieg der Unlöslichkeit im Bereich
unterhalb von pH 6,5, z. B. im Bereich von pH 6,0 bis pH 5,0 erreichen (siehe
Beispiel 6).

b) Erzeugung von Komplexe durch intermolekulare Vernetzung

Die Carboxylgruppen der (Meth)acrylat-Copolymere sind chemisch reaktiv und
eigenen sich zur Modifikation mit dem Ziel der Erzeugung Komplexe durch
intermolekulare Vernetzung. So lassen sich z. B. relativ leicht durch chemische
Modifikation mittels NH₂-CH₂-CH₂-SH SH-Gruppen in die (Meth)acrylat-
Copolymere einführen.

Über die 5'- und 3'-ständigen OH-Gruppen von Nukleinsäuren können ebenfalls leicht mittels $\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ SH-Gruppen in DNA und RNA, insbesondere Oligonukleotide, Antisense-DNA oder Antisense-RNA eingeführt werden.

SH-modifizierte (Meth)acrylat-Copolymere und SH-modifizierte Nukleinsäuren können durch Bildung von S-S-Brücken zu Komplexen vernetzt werden. Durch die Zunahme im Molekulargewicht und die verminderte Löslichkeit werden die Komplexe in Granula-Form insbesondere phagocytotischen Zellen zugänglich, was bei der Behandlung bestimmter Krankheitsbilder wie z. B. (Auto)immunerkrankungen von Vorteil sein kann.

Die erfindungsgemäßen Polymere werden in Kombination mit Wirkstoffen eingesetzt und bilden ein in der Regel partikuläres Drug Delivery System. Dazu kann der Wirkstoff über einen biologisch abbaubaren Spacer an das Polymer gebunden werden. Bevorzugt sind jedoch auch Konjugate mit kationischen niedermolekularen oder polymeren Substanzen. Zu nennen sind kationische Lipide wie Lipofectin, Polylysin, Polythylenimin, Polyamino(meth)acrylat oder Spermin und Spermidine und deren Derivate. Dieser Komplex kann auch ein kationisches oder anionisches Liposom sein.

Die an sich bekannten Komplexbildner können in unterschiedlicher Weise wirkungsverstärkende Effekte aufweisen (z. B. Polyethylenimin).

Weitere Bestandteile der Komplexe können hydrophile Polymere sein (Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon, Polylaktide, Polyglykole, Polysaccharide und deren Derivate. Diese Substanzen schützen die Wirkstoffe vor

Interaktionen mit Bestandteilen des Blutes und verlängern die Zirkulation im Blut.

Antikörper gegen zellspezifische Antigene können für das zellspezifische Targeting verwendet werden.

Herstellung der partikulären Freigabesysteme erfolgt nach üblicher Technik, z. B. durch direkte Komplexierung in Lösung, Trocknung lipidhaltiger Lösungen und Redispergierung in Wasser, gegebenenfalls unter Einsatz von Ultraschall oder Homogenisation.

Bestandteil einer Arzneiform, die der üblichen Technik der vorgesehenen Anwendung entspricht und eine sichere unter verträgliche Therapie erlaubt. Zur Verlängerung der Haltbarkeit können die Arzneiformen gefrier- oder sprühgetrocknet sein.

BEISPIELE

1. Copolymere der Beispiele 1 bis 7

Copolymer A:

Copolymer aus

50 Gew.-% Methacrylsäure und

50 Gew.-% Methylmethacrylat.

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 25.000.

Copolymer B:

Copolymer aus

50 Gew.-% Methacrylsäure und

50 Gew.-% Ethylacrylat.

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 25.000.

Copolymer C:

Copolymer aus

30 Gew.-% Methacrylsäure,

35 Gew.-% Ethylacrylat und

35 Gew.-% Methylacrylat

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 25.000.

Copolymer D:

Copolymer aus

30 Gew.-% Methacrylsäure,

70 Gew.-% Methylmethacrylat

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 25.000.

Copolymer E (nicht erfindungsgemäß)

Copolymer aus

10 Gew.-% Methacrylsäure,

45 Gew.-% Methylmethacrylat und

45 Gew.-% Methylacrylat

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 25.000.

Copolymer L-100 (EUDRAGIT® L, nicht erfindungsgemäß)

Copolymer aus

50 Gew.-% Methacrylsäure und

50 Gew.-% Methylmethacrylat.

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 100.000.

Copolymer L-100-55 (EUDRAGIT® L100-55, nicht erfindungsgemäß)

Copolymer aus

50 Gew.-% Methacrylsäure und

50 Gew.-% Ethylacrylat

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 250.000.

Copolymer S-100 (EUDRAGIT® L100-55, nicht erfindungsgemäß)

Copolymer aus

30 Gew.-% Methacrylsäure und

70 Gew.-% Methylmethacrylat.

Mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) = M_w ca. 100.000.

Beispiel 1:

PH Übergangsbereiche (löslich zu unlöslich).

Durch Messung der Lichtstreuung bei 37 °C und pH-Werten von 3,0 bis 7,5 in Wasser sollte untersucht werden, in welchen pH-Bereichen die Copolymere unlöslicher Form vorliegen. Bei Unlöslichkeit geht die Intensität der Lichtstreuung

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt

Tabelle 1

Copolymer	Methacrylsäure [Gew.-%]	Methylmethacrylat [Gew.-%]	Ethylacrylat [Gew.-%]	Methylacrylat [Gew.-%]	Mw X 10 ³ [mol/g]	PH-Bereich, in dem das Copolymer unlöslich ist
A	50	50	-	-	25	3,8 – 4,5
B	50		50		25	4,7 – 5,1
C	30	35	-	35	25	5,0 – 5,6
D	30	70	-	-	25	4,8 – 5,3
E	10	45	-	45	25	4,5 – 7,0
L-100	50	50	-	-	100	3,7 – 4,3
L-100-55	50	-	50	-	250	4,6 – 5,0
S-100	30	70	-	-	100	4,7 – 5,2

Ergebnis:

Die (Meth)acrylat-Copolymere weisen mit Ausnahme von Copolymer E relativ schmale Übergangsbereiche von 0,4 bis 0,7 pH-Einheiten auf, in denen Unlöslichkeit auftritt.

Copolymer E scheint aufgrund seines geringen Gehaltes von 10 Gew.-% Monomeren mit Carboxylgruppenresten einen weiteren pH-Übergangsbereich von 2,5 pH-Einheiten aufzuweisen.

Das Molekulargewicht scheint praktisch keinen Einfluß auf das Löslichkeitsverhalten der Copolymere zu haben.

Beispiel 2:

Konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität bei pH 7,4

Der Cytotoxizitäts-Test mit menschlichen roten Blutzellen wurde in Anlehnung an die Methode von Murthy et al. ausgeführt (N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirell, P.S. Stayton, and S. Hoffman. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Controlled Release*, 61: 137-143 (1999).

Dabei werden menschlichen rote Blutzellen (Red Blood Cell = RBC) durch Zentrifugation in Gegenwart von K3 EDTA erhalten. Die Zellen werden dabei für 5 min bei 4 °C und 200 g sedimentiert und anschließend dreimalig durch erneute Zentrifugation und Aufnahme in Phosphat-gepufferte Saline (PBS-Puffer, 34 mM, pH 7,4, 0,9 % NaCl Gew./Vol. (75 mM)) gewaschen. Die Zellzahl der resultierenden Suspension kann mit einem Hämocytometer bestimmt werden.

Der Hämolyse-Test wird ausgeführt durch Zugabe der menschlichen roten Blutzellen (RBC) im jeweiligen Medium zur einer Copolymer-Suspension bei einer Zellkonzentration von 1×10^8 RBC/ml. Der Ansatz wird für 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Grad der Hämolyse wurde durch spektrometrische Bestimmung des aus lysierten Zellen freigesetzten Hämoglobins im Zentrifugationsüberstand bei 541 nm ermittelt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt

Tabelle 2

Copolymer	Mw X 10 ³ [mol/g]	Hämolytische Aktivität [%] bei pH 7,4 bei einer Copolymer-Konzentration in [µg/ml]				
		150	250	500	2.500	10.000
A	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
B	25	< 5	5	8	30	100
C	25	< 5	5	8	100	100
D	25	< 5	5	60	100	100
E	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100-55	250	< 5	< 5	< 5	< 5	30
S-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Ergebnis:

Die Copolymere B, C und D zeigen ab 500 µg/ml eine hämolytische Aktivität von 5 % (Toxizitätsschwelle) bei pH 7,4. Die hämolytische Aktivität von Copolymer B ist dabei geringer als die von C und D.

Die Copolymere A, E, L-100, L-100-55 und S-100 wirken auch bei hohen Konzentrationen bis 10.000 µg/ml nicht hämolytisch. Das Copolymer L-100-55, bis auf sein Molekulargewicht übereinstimmend mit Copolymer B, zeigt bei 10.000 µg/ml eine geringe hämolytische Aktivität.

Die Copolymer A und B unterscheiden sich bei übereinstimmend 50 Gew.-% Methacrylsäure-Gehalt nur im Co-Monomer Methylmethacrylat bzw. Ethylacrylat. Das etwas hydrophobere Copolymer B ist bereits ab 250 µg/ml

hämolytisch. Das Copolymer A ist dagegen auch bei 10.000 µg/ml nicht hämolytisch.

Beispiel 3:

Hämolytische Wirkung der Copolymere B und C bei verschiedenen Konzentrationen bei pH 5,0 und pH 5,5.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Copolymer	PH-Wert	Hämolytische Aktivität [%] bei einer Copolymer-Konzentration in [µg/ml]				
		25	50	100	150	250
B	5,0	10	80	85	90	90
B	5,5	60	90	95	90	90
C	5,0	< 5	< 5	10	60	80
C	5,5	5	50	80	85	85

Ergebnis:

Copolymer B ist bei pH 5,0 und bei pH 5,5 stärker hämolytisch als Copolymer C, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen von 25 und 50 µg/ml. Bei pH 5,5 und 150 µg/ml sind beide Copolymere sehr wirksam.

Beispiel 4:

Hämolytische Wirkung bei einer Copolymerkonzentration von 150 µg/ml und verschiedenen pH-Werten.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 4 dargestellt

Tabelle 4

Copolymer	Mw $\times 10^3$ [mol/g]	Hämolytische Aktivität [%] bei pH bei einer Copolymer-Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$				
		5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
A	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
B	25	80	55	< 5	< 5	< 5
C	25	90	55	< 5	< 5	< 5
D	25	< 5	5	< 5	< 5	< 5
E	25	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
L-100-55	250	95	80	< 5	< 5	< 5
S-100	100	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Ergebnis:

Die Copolymer B, C und L 100-55 zeigen in einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ im Bereich von pH 5,5 bis 6,0 starke hämolytische Aktivität. Alle Copolymere enthalten Ethylacrylat als Co-Monomer. Das Mw von L 100-55 ist jedoch für Anwendungen zu hoch.

Beispiel 5:

Die Wirkung der Copolymere auf Makrophagen-Zelltypen sollte untersucht werden. Im Gegensatz zu roten Blutzellen bei denen die Zellyse vermutlich hauptsächlich durch eine Interaktion der Copolymere mit der äußeren Zell-Membran erfolgt, können die Makrophagen-Zelltypen die Copolymere aktiv aufnehmen, so daß davon auszugehen ist, daß hier andere Wechselwirkungen eine Zellyse verursachen können. Da die Bestimmung der Zellyse relativ ungenau ist, werden zwei Test-Systeme kombiniert: Der MTT-Test auf überlebende Zellen und der LDH-Test auf abgetötete Zellen

MTT-Test

MTT-Test (Inhibierung von Zellen einer Makrophagen-Typ Zelllinie).
Der colorimetrische Test weist lebende Zellen nach, die den gelben MTT-Farbstoff zu einem dunkelblauem Formazan-Produkt reduzieren. Der Test eignet sich zum Nachweis von Cytotoxizität, Zellproliferation und Zellaktivierung. Dienen (siehe z. B. T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65:55-63 (1983)).

J 774 Maus Makrophagen-Typ Zellen werden in DMEM-Medium, enthaltend 10 Vol/Vol-% fötales bovines Kälberserum (vorbehandelt 56 °C, 30 min) und 1 Vol/Vol-% Penicillin G, suspendiert. Die Zellen werden zu 100 µl Portionen, enthaltend 5×10^3 Zellen, in eine Mikrotiterplatte mit 96-Kavitäten verteilt und für 24 h bei 37 °C unter H₂O gesättigter Atmosphäre enthaltend 5 % CO₂ inkubiert. Es werden 20 µl steriler Copolymerlösung in Phosphatpuffer zugegeben und Reihen-Verdünnungen von 0,5 mg/ml bis 0,003125 ausgeführt (Kontrollen erhalten Phosphatpuffer ohne Copolymer). Anschließend wird für weitere 48 h inkubiert.

Aus einer sterilen MTT-Lösung (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) in Phosphatpuffer (5 mg/ml) werden 10 µg in jede Kavität gegeben und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 100 µl einer 10 Gew./Vol-% Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) in 0,01 HCl zugegeben um reduziertes MTT zu solubilisieren. Es erfolgt eine spektrometrische Messung der Absorption nach 24 h bei 570 nm, die bezogen auf eine 100 % Überlebensrate im Kontrollversuch ohne Copolymerzugabe, ausgewertet wird.

LDH-Test

Der colorimetrische Test weist aus abgetöteten Zellen freigewordene Lactosedehydrogenase (LDH)-Aktivität nach. Der Test wird analog zum MTT-Test mit J774 Zellen in Mikrotiterplatten ausgeführt. Nach 48 h Inkubation werden je 4 µl des Überstandes mit einem handelsüblichen LDH-Test-Kit auf LDH-Aktivität getestet. Die Auswertung erfolgt bezogen auf eine 100 % Zellyse (Toxizität) im Kontrollversuch ohne Copolymerzugabe. Der 100 % - Wert wird dabei nach Inkubation eines Zell-Aliquots in Gegenwart von Triton X-100 zur vollständigen Zellyse bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Copolymer	MAA	MMA	EA	MA	MTT-Test % MTT (lebende Zellen)		LDH-Test % LDH (abgetötete Zellen)	
					0,03125 [mg / ml]	0,5 [mg / ml]	0,03125 [mg / ml]	0,5 [mg / ml]
A	50	50	-	-	90	110	< 5	< 5
B	50		50		35	20	35	40
C	30	35	-	35	105	80	< 5	15
D	30	70	-	-	100	100	< 5	< 5
E	10	45	-	45	100	< 5	< 5	40

MAA = [Gew.-%] Methacrylsäure
 MMA = [Gew.-%] Methylmethacrylat
 EA = [Gew.-%] Ethylacrylat
 MA = [Gew.-%] Methylacrylat

Ergebnis:

Die MTT-Test und LDH-Test erhaltenen Meßwerte stimmen qualitativ überein. Copolymer B ist für die J774 bereits in geringer Konzentration am toxischsten. Bei den Copolymeren A und D konnte keine toxische Wirkung festgestellt werden. Copolymer E, das bei roten Blutzellen in Beispiel 4 keine Hämolyse verursacht, erweist sich in einer Konzentration von 0,5 mg/ml als toxisch für die J774 Zellen. Copolymer C erweist sich in einer Konzentration von 0,5 mg/ml als leicht toxisch für die J774 Zellen.

Beispiel 6

PH-abhängige Konformations-Änderung (Transition) der Copolymere A bis E.

Pyrene Fluoreszenz

Der Fluoreszenz-Farbstoff Pyrene kann dazu verwendet werden, die Transition pH sensibler Polymere bei unterschiedlichen pH-Werten zu verfolgen (siehe z. B.: K. Kalyanasundaram and J. K. Thomas. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems, *J. Am. Chem. Soc.* 99:2039-2044 (1977)).

Die Übergänge von hydrophilen Knäuelstrukturen (Coil) zu hydrophoben Globulinstrukturen gehen einher mit einer Veränderung des Fluoreszenz-Verhältnisses bei den Wellenlängen $I_1 = 372 \text{ nm}$ und $I_3 = 383 \text{ nm}$ (I_1 / I_3 - Verhältnis). Zur Messung wird Pyrene einfach der Copolymer-Lösung zugegeben.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Copolymer	MAA	MMA	EA	MA	Pyrene-Emission (I _{372 nm} / I _{383 nm})			
					pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,4
A	50	50	-	-	1,32	1,39	1,45	1,52
B	50		50		1,25	1,39	1,46	1,48
C	30	35	-	35	1,27	1,31	1,35	1,46
D	30	70	-	-	1,22	1,23	1,27	1,36
E	10	45	-	45	1,27	1,26	1,26	1,26

Ergebnis:

Die Copolymere A und B (50 Gew.-% Methacrylsäure) zeigen die ausgeprägteste Transition von pH 7,4 nach pH 5,5, gefolgt von den Copolymeren C und D (30 Gew.-% Methacrylsäure). Copolymer E (10 Gew.-% Methacrylsäure) zeigt praktisch kein Transitionsverhalten. Das Transitionsverhalten scheint mit dem Methacrylsäure-Gehalt der Copolymere zu korrelieren, jedoch nicht mit der hämolytischen Aktivität der Copolymere (siehe Beispiele 2 und 4).

Beispiel 7

Kopplung von Copolymer B mit dem Farbstoff Lissamine® (Rhodamin B)

Der Test wird wie in K. Abdellaoui, M. Boustta, M. Vert, H. Morjani, M. Manfait. (1998) Eur J Pharm Sci 6, 61-73 beschrieben ausgeführt mit folgenden Modifikationen. Der Carboxylgruppenaktivator N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) wurde durch 1,3-diisopropylcarbodiimide (DIPC) ersetzt. 4-(Dimethyl-amino)-Pyridine (DMAP) und Triethylamin werden in katalytischen Mengen zugesetzt. Die Reaktion wird für 4 Tage ausgeführt.

250 mg Copolymer B wurden in 1 ml zuvor destilliertem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Anschließend wurden 0,5 mg/ml (3×10^{-3} mmol) 1,3-Di-Isopropyl-carbodiimid (DIPC) zur Aktivierung der Carboxylgruppen zugegeben. Nach 30 min wurden katalytische Mengen Triethylamin und 4-(Dimethyl-amino)-Pyridin und Lissamine® Rhodamin B Ethylen-di-Amin (1 mg/ml, $1,5 \times 10^{-3}$ mmol), gelöst in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 96 h unter Argon im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde durch ein 0,2 µm Filter zur Entfernung des präzipitierten DIPC-Nebenproduktes gegeben. Das enthaltene THF wurde unter Vacuum abgezogen. Das Roh-Produkt wurde in Chloroform/Ethanol (85/15 vol./vol.) gelöst. Über eine Silica-Gel-Säule wurden das nicht gekoppelte und das gekoppelte Copolymer getrennt. Der Elutionsvorgang wurde dabei durch Dünnschichtchromatographie überwacht. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösemittel unter Vacuum abgezogen. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und gegen eine 3.500 Dalton Membran dialysiert für 3 Tage gegen Wasser/Methanol (50/50), um Reste nicht kovalent gebundenen Rhodamin B zu entfernen. Danach wurde die Dialyse für 2 Tage gegen Phosphatpuffer pH 9 und für 2 weitere Tage gegen destilliertes Wasser fortgesetzt. Das erhaltene Produkt wurde für 72 h gefriergetrocknet.

Der Rhodamin B-Gehalt im Copolymer wurde durch Spektrofluorometrie in Methanol bei Raumtemperatur bestimmt ($\lambda_{\text{exo}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$).

Die Ausbeute betrug 83 % purpurfarbenen Copolymers. Es wurde eine Rhodamin B-Bindung von 0,04 mol-% ermittelt, was bedeutet, daß theoretisch ein von 9 Copolymer-Molekülen mit einem Rhodamin-Molekül gekoppelt ist.

Das Löslichkeitsverhalten bei verschiedenen pH-Werten sollte im Vergleich zu nicht mit Rhodamin B gekoppeltem Copolymer B geprüft werden.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7

pH	Unlöslichkeit (Präzipitation) in [%] bei pH-Wert					
	4,2	4,5	5,3	5,6	6,0	7,0
Copolymer B	100	70	5	< 5	< 5	< 5
Copolymer B-Rhodamin B	70	70	100	10	< 5	< 5

Ergebnis:

Die Rhodamin-Kopplung von Copolymer B bewirkt eine deutliche Änderung des Löslichkeitsverhaltens. Es erfolgt ein steiler Anstieg ab ca. pH 5,6 zu 100 % Unlöslichkeit bei pH 5,3. In Gegensatz dazu zeigt das nicht gekoppelte Copolymer B erst bei pH 4,2 100 % Unlöslichkeit. Der Anstieg in diesen Bereich erfolgt deutlich flacher ab ca. pH 5,3.

Beispiel 8

Herstellverfahren: Es wird jeweils ein Beispiel für die Herstellverfahren 1 und gegeben. Die Mengenanteile können wie in der nachstehenden Tabelle angegeben variiert werden.

Aus den Meßwerten der Viscosität $\eta_{spez/o}$ (cm³/g) kann die Molmasse (Mw, Gewichtsmittel) bezogen auf die Viscosität von Polymethylmethacrylat (PMMA) bei 25°C in CHCl₃ näherungsweise berechnet werden. Man benutzt dazu die nachstehende empirisch ermittelte Formel:

$$M = \left(\frac{[\eta]}{4,976 \cdot 10^{-3}} \right)^{\frac{1}{0,796}}$$

Herstellverfahren 1

In einem Reaktionsgefäß mit 2 l Fassungsvermögen, ausgerüstet mit Rückflußkühler, Rührwerk und Zulaufgefäß wurden 1430 g dest. Wasser, 3,78 g Natriumlaurylsulfat, 12,6 g Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat und 1,26 g Ammoniumperoxodisulfat, gelöst in 20 g dest. Wasser, vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde bei 81°C eine Monomermischung bestehend aus:

270 g Ethylacrylat
270 g Methacrylsäure
27 g 2-Ethylhexylthiocyclolat

innerhalb 2,5 Stunden zudosiert.

Nach Zulaufende wurde der Ansatz noch 2 Stunden bei 81°C gehalten, ein Gemisch von 0,176 g Silicon-Antischaumemulsion SE-2MC und 10 g dest. Wasser, zugegeben und im Vakuum bei ca. 300 mbar 95,42 g dest. Wasser abgezogen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Dispersion hat einem Feststoffgehalt von 30%.

Herstellverfahren 2

In einem Reaktionsgefäß mit 2 l Fassungsvermögen, ausgerüstet mit Rückflußkühler, Rührwerk und Zulaufgefäß wurden 774 g dest. Wasser, 1,092 g Natriumlaurylsulfat und 1,4 g Natriumperoxodisulfat, gelöst in 10 g dest.

Wasser, vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde bei 75°C eine Emulsion bestehend aus:

390 g Methylacrylat
150 g Methylmethacrylat
60 g Methacrylsäure
1,008 g Natriumlaurylsulfat
7 g Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat
30 g 2-Ethylhexylthioglycolat
820,99 g dest. Wasser

Innerhalb 4 Stunden zudosiert.

Nach Zulaufende wurde der Ansatz noch 2 Stunden bei 75°C gehalten; ein Gemisch aus 0,21 g Silicon-Antischaumemulsion SE-2MC und 10 g dest. Wasser, zugesetzt und bei ca. 300 mbar 120 g dest. Wasser abgezogen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Dispersion hat einen Feststoffgehalt von 30%.

Ansatz Nr.	Polym.-zus.-stz. (Gew.-%)	Regler (Tie)	Herstell.-verfahren	Polym.-temp. (°C)	Emulgator (Tie)	Initiator (Tie)	Feststoffgehalt (%)	η_{sp}/c (cm ³ /g)	ber. M_w^{****}
1	A-B-C=65-25-10	5 G	2	75	0,15 l 0,5 K	0,1 l	30	10	14114
2*	B-C=51-49	3 G	2	80	0,125 l	0,125 J	40	17,7	28918
3	D-C=50-50	5 G	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	13	19924
4**	B-C=70,7-29,3	5 G	2	80	0,125 l	0,13 J	40	10,2	14469
5	A-D-C=40-30-30	5 G	2	75	0,15 l	0,1 l	30	11,7	17191
6	D-C=50-50	5 G	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	13,7	20861
7	D-E-C=49,5-0,5-50	5 G	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	13,9	21346
8	D-E-C=49-1-50	5 G	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	13,9	21346
9	D-E-C=49,5-0,5-50	10 H	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	12,3	18306
10	D-E-C=49-1-50	10 H	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	12	17747
11	D-F-C=40-10-50	10 H	1	81	0,3 l 1 K	0,1 J	30	12	17747
12	A-D-M=40-30-30	5 G	2	75	0,15 l	0,13 J	30		

* Endpolymerisation mit 0,01 Tie Natriumdisulfit, 0,0007 Tie Eisen-(II)-sulfat, 0,05 Tie Ammoniumperoxodisulfat
 ** Endpolymerisation mit 0,01 Tie Natriumdisulfit, 0,0007 Tie Eisen-(II)-sulfat, 0,055 Tie Ammoniumperoxodisulfat

$$**** \text{ berechnete Molmasse (Mw) bezogen auf PMMA bei } 25^\circ\text{C/CHCl}_3 \quad M = \left(\frac{[\eta]}{4,976 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,756}$$

A= Methacrylat
 B= Methylethacrylat
 C= Methacrylsäure
 D= Ethylacrylat
 E= Dodecylmethacrylat

F= Butylmethacrylat
 G= 2-Ethylhexylthioglycolat
 H= Dodecylmercaptan
 I= Natriumlaurylsulfat
 J= Ammoniumperoxodisulfat

K= Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat
 L= Natriumperoxodisulfat
 M= Acrylsäure

PATENTANSPRÜCHE

1. PH-sensitives Polymer, das ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

20 bis 65 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
75 bis 35 Gew.-% Einheiten von C₁- bis C₁₈-Alkylestem der
(Meth)acrylsäure ist,

dadurch gekennzeichnet, daß

es ein Molekulargewicht im Bereich von 1.000 bis 50.000 g/mol aufweist

und in einer Konzentration von 150 µg/ml im Cytotoxizitäts-Test mit
menschlichen roten Blutzellen bei pH 5,5 eine Hämolyse von mindestens
60 % und bei pH 7,4 eine Hämolyse von weniger als 1 % bewirkt.

2. PH-sensitives Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
es ein

ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

20 bis 60 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
60 bis 80 Gew.-% Methylmethacrylat -Einheiten ist.

3. PH-sensitives Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein

ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

40 bis 60 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
60 bis 40 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten ist.

4. PH-sensitives Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein

ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

40 bis 60 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten,
60 bis 40 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten und
2 bis 20 Gew.-% Butylmethacrylat ist.

5. PH-sensitives Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein

ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

40 bis 60 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten,
60 bis 40 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten und
0,1 bis 2 Gew.-% Einheiten eines C₈- bis C₁₂-Esters der Acryl-
oder Methacrylsäure ist

6. PH-sensitives Polymer nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es bei einer Konzentration von 0,03125 mg / ml im MTT-Test mit dem Maus-Makrophagen-Zelltyp J774A.1 (ATCC TIB-67) einen Wert von höchstens 50 bezogen auf eine 100 % Überlebensrate im Kontrollversuch bewirkt.
7. PH-sensitives Polymer nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß bei einer Konzentration von 0,03125 mg / ml im LDH-Test mit dem Maus-Makrophagen-Zelltyp J774A.1 (ATCC TIB-67) einen Wert von mindestens 20 % bezogen auf 100 % Zellyse (Toxizität) im Kontrollversuch bewirkt.
8. PH-sensitives Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein

ein (Meth)acrylat-Copolymer aus

20 bis 40 Gew.-% Methacrylsäure-Einheiten und
25 bis 45 Gew.-% Methylmethacrylat -Einheiten,
25 bis 45 Gew.-% Ethylacrylat-Einheiten, ist.
9. PH-sensitives Polymer nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es als Konjugat mit einem pharmazeutisch wirksamen natürlichen oder synthetischen Biomolekül oder einem pharmazeutische Wirkstoff vorliegt.
10. PH-sensitives Polymer nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein mit einem konformationsändernden Agens gekoppelt ist.

11. PH-sensitives Polymer nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es Bestandteil eines nach chemischer Modifikation über Nukleinsäuren vernetzten Komplexes ist.
12. Verfahren zur Herstellung eines pH-sensitives Polymers nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 durch radikalische Polymerisation der Monomeren in Gegenwart von Polymerisationsinitiatoren und Molekulargewichtsreglern mittels Block-, Perl- oder Emulsionspolymerisation, Gruppentransfer-Polymerisation (GTP), Atom-Radikal-Transfer-Polymerisation (ATRP) und Austragen des Polymerisats, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymerisat in einem organischen Lösemittel gelöst wird, durch mehrfache Dialyse gegen Wasser gereinigt und anschließend gefriergetrocknet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Molekulargewichtsregler Dodecylmercaptan und/oder 2-Ethylhexylthioglycolat einsetzt.
14. Verwendung eines PH-sensitiven Polymers nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 als Träger für natürliche oder synthetische Biomoleküle oder pharmazeutische Wirkstoffe gegebenenfalls als Bestandteil von Mikropartikeln, Nanopartikeln, Liposomen, Emulsionen und/oder Lipidvisikeln.
15. Verwendung nach Anspruch 14 als Träger für Lipide, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren (DNA und RNA), insbesondere Oligonukleotide, Nucleoside, Antisense-DNA oder Antisense-RNA, Nukleotide, Toxine, Immunotoxine, Antikörper oder Fragmente von Antikörpern.

16. Verwendung nach Anspruch 14 als Träger für pharmazeutische Wirkstoffe aus den Wirkstoffklassen Analgetika, Antiallergika, Antirheumatika, Antibiotika, Antiinfektiva, Antiparkinsonmittel, Antipsoriatika, Antitumormittel, Dermatika, Gichtmittel, Immunregulatoren, Magen-Darmmittel, neurotrope Mittel, Ophthalmika, Zytostatika.
17. Verwendung des eines pH-sensitives Polymers nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 als Bestandteil einer dermalen, transdermalen, parenteralen, nasalen, pulmonalen, vaginalen oder oralen Arzneiform.
18. Verwendung nach Anspruch 17 in einer Arzneiform zur Therapie von Krebs, Infektionen (einschließlich HIV), Herz-Kreislauserkrankungen (z. B. Arteriosklerose), Arthritis, neurodegenerative Erkrankungen (Parkinson, Multiple Sklerose, Alzheimer), genetisch bedingte Enzymmangelerkrankungen, Hepatitis B und C, Mukoviszidose, Hypercholesteremie, Mongolismus, Muskeldystrophie, Autoimmunkrankheiten Gürtelrose und Herpes, Psoriasis, CMV-Retinitis, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa oder Diabetes.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.